

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006429

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-089063
Filing date: 25 March 2004 (25.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 5 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 9 0 6 3

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

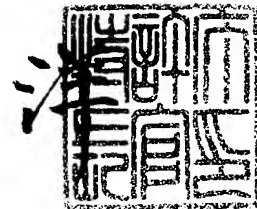
J P 2 0 0 4 - 0 8 9 0 6 3

出 願 人
Applicant(s): 五十嵐 一衛
株式会社 フューエンス

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PJ022757
【提出日】 平成16年 3月25日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/26
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区東千葉3-3-2
【氏名】 五十嵐 一衛
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区矢作町4-9-4-9
【氏名】 上田 志朗
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区東千葉3-1-1-5
【氏名】 佐伯 直勝
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区幸町1-1-1-1805
【氏名】 柏木 敬子
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市若葉区愛生町5-7-5 ワンダーランド207号
【氏名】 富取 秀行
【特許出願人】
【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区東千葉3-3-2
【氏名又は名称】 五十嵐 一衛
【特許出願人】
【識別番号】 302064588
【氏名又は名称】 株式会社 フェーエンス
【代理人】
【識別番号】 100072051
【弁理士】
【氏名又は名称】 杉村 興作
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 074997
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0216261

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞を診断する方法。

【請求項 2】

前記ポリアミンがスベルミン、スベルミジンまたはブトレッシンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ポリアミンから生成される前記アルデヒド体がアクロレインである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングする方法。

【請求項 5】

前記ポリアミンがスベルミン、スベルミジンまたはブトレッシンである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

ポリアミンから生成される前記アルデヒド体がアクロレインである、請求項 4 記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性を指標とした脳卒中・無症候性脳梗塞の診断方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性を指標とした脳卒中・無症候性脳梗塞の診断方法に関する。更に本発明は、ポリアミン、アクロレインの含有量又はポリアミンオキシダーゼ活性を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脳血管疾患は悪性新生物、心疾患に次ぐ死因であり、その年間死亡数は腎疾患の10倍近く、また罹患後の後遺症は麻痺・運動不能を伴うなど、日常生活に極めて多大な支障を来す。脳血管疾患の大半を占める脳卒中は早期発見・早期治療が困難な疾患である。また自覚症状を伴わない無症候性脳梗塞は、画像診断により偶然に発見されるケースが大半であり、血液・尿検査等に利用される診断マーカーが存在しないのが現状である。その為、画像診断などの高価な機器を必要としない、簡易で、確度の高い診断方法の開発が望まれている。

【0003】

ところでポリアミンは生体内において普遍的に見出される生体アミンであり、スベルミン、スベルミジン、スベルミンなどに代表される。そしてそれらのポリアミンは細胞内に高濃度(mMオーダー)に存在し、生体内において核酸と相互作用することにより細胞増殖因子として作用する。一方、ポリアミンはその代謝過程で、細胞にとって毒性の高いアクロレイン($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$)を産生する。このアクロレインは細胞内ではアルデヒドデヒドロゲナーゼにより無毒化されるが、細胞外に漏出すると強い毒性を示す。

【0004】

なお、慢性腎不全患者の血漿中にはポリアミンが蓄積していることから、ポリアミンは尿毒素の原因物質の一つであろうとされている。そのうえ、このポリアミンを透析により十分に取り除くことは困難であるといわれている。そこでポリアミンから誘導される毒性の本体を明らかにすることは、尿毒症のより有効な治療薬の開発につながる。

【0005】

そのような観点から本発明者らは、ポリアミンよりアクロレインを生成する経路において作用しているポリアミンオキシダーゼを、アミノグアニジンを用いて阻害することを試みた。そしてその結果ポリアミンは毒性を示さなくなることが確認されている(特開2002-281999号公報)。組織破壊を伴う疾患においては、細胞内より遊離したポリアミンが血漿中のポリアミンオキシダーゼにより酸化的脱アミノ化を受けてアクロレインが大量に産生し、生成したアクロレインが毒性に関与している可能性が極めて高い。

【0006】

【特許文献1】特開2002-281999号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記で述べたように腎疾患における尿毒症に、ポリアミンの酸化分解により発生したアクロレインが関与していることは知られていた。しかしその他の疾患、例えば脳卒中などの脳血管疾患においてアクロレインが関与しているかどうかの知見は不足していた。なお、脳卒中とは脳血管の病的過程により急激に起こる局所精神・神経症状を表すものであり、その原因疾患として重要なものには脳梗塞や脳内出血などが挙げられる。よって本発明の課題は、脳卒中などの脳血管疾患において生体内のポリアミンあるいはアクロレインの含量が量的に変化するかどうかを検討することである。脳卒中患者においてアクロレインの量に変化が見られるならば、アクロレインを指標にして脳卒中・無症候性脳梗塞を診断す

ることが可能となる。またポリアミンからアクロレインが生成する過程には血漿中のポリアミンオキシダーゼが関与しているので、脳卒中患者においてポリアミンオキシダーゼの活性が変化しているか否かを検討することも本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、被験者の血漿中に含まれるアクロレイン含量、ポリアミン含量およびポリアミンオキシダーゼ活性を測定し、脳梗塞・脳内出血の患者群と、健常者群あるいは他の脳疾患の患者群との間に差があるか比較を行なった。その結果、脳梗塞・脳内出血の患者群においては、健常者群あるいは他の脳疾患の患者群と比較して、血漿アクロレイン含量とポリアミンオキシダーゼ活性が明らかに高いことが認められた。その後被験者において磁気共鳴画像診断法（MRI）で頭部断層画像を撮影する事により、血漿アクロレイン含量とポリアミンオキシダーゼ活性が高い被験者では梗塞がある事を確認し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち本発明は、脳卒中・無症候性脳梗塞の発見・予知のための診断方法を提供するものである。本発明によれば血漿中のアクロレイン量、ポリアミンオキシダーゼ活性、ポリアミン量を測定する事により、脳卒中・無症候性脳梗塞の予知、発見をすることができる。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、血漿中のアクロレイン含有量、ポリアミン含有量、あるいはポリアミンオキシダーゼ活性の測定を行なうことにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングを行なう方法を提供するものである。本発明の知見は、ポリアミンオキシダーゼを介する酸化的脱アミノ化により生体内ポリアミンからアクロレインを生成する経路を阻害することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞を予防したり、病状の進捗を阻止することができる可能性を示唆するものである。更に本発明の知見は、ポリアミンオキシダーゼを阻害する化合物を探索することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の治療薬を得ることができる可能性をも示唆するものであり、種々の応用が可能であると考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明において、ポリアミンの酸化分解により発生するアクロレインが脳梗塞・脳内出血の患者の血清中に多く存在する事を見出した。また脳梗塞・脳内出血の発見・予知に、血漿中のアクロレイン含量、ポリアミン含量およびポリアミンオキシダーゼ活性の上昇を用いることができる事を実証した。

【0012】

よって本発明は、被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞を診断する方法である。また本発明は、被験者から生体サンプルを採取し、該サンプル中におけるポリアミンの含有量又は該ポリアミンから生成されるアルデヒド体の含有量、若しくは該サンプル中におけるポリアミンオキシダーゼ活性を測定し、得られた測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングする方法である。

【0013】

本発明においては被験者から、まず測定に使用する生体サンプルを採取する。本発明において使用される生体サンプルは、好ましくは下記の実施例において使用している血漿である。しかし他の生体サンプルも適宜使用することが可能であり、その様な他の生体サンプルとして、例えば尿、唾液、脳脊髄液や骨髄液などを挙げることが可能である。

【0014】

なお本願明細書においてポリアミンとは、第一級アミノ基を二つ以上もつ直鎖の脂肪族

炭化水素を意味するものである。知られている生体ポリアミンには、ブトレッシン、カダベリン、スベルミジン、スベルミン、1,3ジアミノプロパン、カルジン、ホモスベルミジン、3-アミノプロピルカダベリン、ノルスベルミン、テルモスベルミン、カルドペンタミンなどがあるが、それらに限定されるものではない。なお本発明において好適なポリアミンはブトレッシン、スベルミジン、スベルミンである。

【0015】

上記のポリアミンは酸化、アセチル化、アミノ基転移、カルバモイル化による代謝を受けるが、ポリアミンオキシダーゼはポリアミンの酸化に関与する酵素である。なお本願明細書においてポリアミンオキシダーゼとは、ジアミンまたはポリアミンを良い基質として酸化し、過酸化水素を発生する酵素を意味するものである。ポリアミンは、ポリアミンオキシダーゼによる酸化的脱アミノ化を受け、その結果アクロレインなどのアルデヒド体が生成する。なお本発明において好適なアルデヒド体はアクロレインであるが、それに限定されるものではない。

【0016】

血漿中のアクロレイン含量は、アクロレイン付加アミノ酸であるFDP-リジン（N-ホルミルピペリジノ・リジン）の含有量を測定する事により同定することができる。FDP-リジンの含有量は、例えばACR-LYSINEADDUCT ELISA SYSTEM（日本油脂株式会社）を使用し、添付のマニュアルに従って測定することができる。なおアクロレイン含量はFDP-リジン以外の誘導体の形で測定することも可能である。またアクロレイン含量を直接測定することも可能であり、かかる方法は例えばAlarconらの報告（Alarcon R. A. (1968) Anal.Chem. 40, 1704-1708）に記載されている。しかしアクロレインは他の分子との反応性が高いために、遊離の形で血中に存在する量が少ないという問題がある。そこで、FDP-リジンの形で測定することが簡便であることも併せて考えると、本発明において、FDP-リジンの形でアクロレインを測定することは好適な態様である。

【0017】

具体的には、患者血清及び標準液を抗原固定化プレートに50 μ l/wellずつ分注し、さらに一次反応抗体液を同量加える。室温で30分静置した後、液を取り除き、洗浄液で洗浄後、二次反応抗体液を100 μ l/well分注する。室温で一時間静置後、洗浄液で洗浄し、発色液を加え室温で15分静置することで発色させる。プレートリーダーにより、450nmの吸光度測定をすることにより、血漿中アクロレイン量は、患者血清1ml当たりのFDP-リジン含有量（nmol/ml plasma）として表示される。

【0018】

ポリアミンオキシダーゼの活性測定は、例えば下記の実施例において示す様に、10mM-Tris塩酸塩（pH7.5）、0.2mMの基質（スベルミン、スベルミジン及びブトレスシン）及び0.03mlの患者血清の反応混合液0.15mlを37℃にて48時間インキュベーションすることにより行なうことができる。0.02mlの反応混合液に最終濃度5%のトリクロロ酢酸（TCA）を加え、遠心分離する。得られた上清の一部をポリアミンのアッセイに使用する。アミンオキシダーゼ活性は患者血清1ml当たりのスベルミン分解により生成したスベルミジン量（nmol/ml plasma/48h）で表示することができる。

【0019】

ポリアミンオキシダーゼの酵素活性測定方法は種々の報告において記載されており、そのような文献として、Sharminらの報告（Sharmin et al., (2001) Biochem. Biophys Res. Commun. 282, 228-235）、Sakataらの報告（Sakata et al., (2003) Biochem. Biophys Res. Commun. 305, 143-149）、Igarashiらの報告（Igarashi et al., (1986) J. Bacteriol. 166, 128-134）などを挙げることができる。かかる報告の記載を基にして当業者は適宜改変を行うことにより、ポリアミンオキシダーゼの酵素活性を測定することができる。

【0020】

試料に含まれるポリアミンの含有量は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定することができる。例えばTOS0から市販されているポリアミンカラムを使用した場合に

は、ポリアミン類（ブトレッシン、スベルミジン、スベルミン）のHPLC上のリテンションタイム（保持時間）は各々7分、12分、25分である。ポリアミン量は患者血清1ml当たりに含まれるブトレッシン、スベルミジン及びスベルミン量（nmol/ml plasma）で表示することができる。なおその他の通常のアミノ酸カラムも、適宜使用することができる。

【0021】

下記の実施例においては、被験者の同意の下、磁気共鳴画像診断法（MRI）により、頭部断層画像を得て梗塞の有無を検討した。その結果下記の実施例に示すように、健常者群において高い値を示した被験者において、脳梗塞の所見が認められた。

【0022】

よって、脳卒中の患者において血漿中のアクロレイン含量、ポリアミン含量あるいはポリアミンオキシダーゼ活性は健常者と比較して高いという本発明の知見を利用して、上記の測定値を指標として、脳卒中・無症候性脳梗塞を診断することができる。また本発明において得られた知見を利用して、上記の測定値を指標として脳卒中・無症候性脳梗塞の患者をスクリーニングすることもできる。例えば健常者群の上記の指標となる測定値の平均値と分散を統計学的に解析し、上記測定値における正常値の上限を設定する。その値を基にして、より高い値を示す被験者は脳卒中・無症候性脳梗塞である可能性が高いと診断することも可能であろう。

【0023】

また本発明の知見は、血漿中のポリアミンオキシダーゼ活性を阻害することにより生体におけるアクロレインの生成を抑制することにより、脳卒中の予防や病状の進捗を阻止することができる可能性も示唆するものである。よって本発明は、脳卒中の治療に関する新たな途を開く可能性を提供するものである。

【0024】

更に、脳卒中の治療に有効である可能性がある候補化合物を実験動物に投与し、該化合物が該実験動物において血漿中のポリアミンオキシダーゼを阻害する活性を有するかを測定することにより、脳卒中の治療に有効である新たな薬剤を探索できると考えられる。よって本発明は、脳卒中の治療に有効な新たな薬剤を探索するための新たな途をも提供するものである。

【実施例】

【0025】

次に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0026】

実施例1：脳梗塞患者に於ける血漿アクロレイン含有量の比較検討

脳疾患患者における血漿アクロレイン含有量を検討した。健常人、脳梗塞・脳内出血群、その他脳疾患群の3群に分けて、採取した血液のアクロレイン含有量を比較した。

【0027】

血漿中アクロレイン量は、アクロレイン付加アミノ酸であるFDP-リジン（N-ホルミルピペリジノ・リジン）の含有量を測定する事で同定した。ACR-LYSINE ADDUCTELISA SYSTEM（日本油脂株式会社）を用い、添付のマニュアルに従って測定した。患者血清及び標準液を抗原固定化プレートに50μl/wellずつ分注し、更に一次反応抗体液を同量加えた。室温で30分静置後、液を取り除き、洗浄液で洗浄し、発色液を加え室温で15分静置することで発色させた。プレートリーダーにより、450nmの吸光度測定をした。血漿中アクロレイン量は患者血清1ml当たりのFDP-リジン含有量（nmol/ml plasma）で表示した。

【0028】

図1に示されるように血漿アクロレイン量を反映するFDP-リジン量は、上記の3群の中で脳梗塞・脳内出血患者が最も高く、他の群に比べ有意に上昇が見られた。また慢性腎不全患者の血漿中アクロレイン量と比較しても、脳梗塞患者のFDP-リジン量は、腎不全患者と同等レベルまで上昇している事が判明した。

【0029】

実施例2：脳梗塞患者における血漿アミノキシダーゼ活性の比較検討

実施例1で用いた患者血漿中のポリアミノキシダーゼ活性を測定した。その結果を図2に示す。血漿中のポリアミノキシダーゼの活性は、10mM-Tris塩酸塩（pH7.5）、0.2mMの基質（スベルミン、スベルミジン及びブトレスシン）及び0.03mlの患者血清の反応混合液0.15mlを37℃にて48時間インキュベーションすることにより測定した。0.02mlの反応混合液に最終濃度5%のトリクロロ酢酸（TCA）を加え、遠心分離した。得られた上清の一部をポリアミンのアッセイに使用した。アミノキシダーゼ活性は患者血清1ml当たりの、スベルミン分解により生成したスベルミジン量（nmol/ml plasma/48h）で表示した。

【0030】

脳梗塞・脳内出血群の血漿中のポリアミノキシダーゼ活性は、健常者群及びその他脳疾患群と比較して有意に上昇していた。この結果は、実施例1で比較検討した血漿中アクロレイン量と相関性を有していた。

【0031】

実施例3：磁気共鳴画像診断法（MRI）による頭部断面画像解析

被験者の許可・同意を得て、MRIにより頭部の断面画像解析を行い、脳梗塞の有無を調べた。健常者（図3A）、脳梗塞患者（図3B）、および病名の診断はついていないが血漿中のアクロレイン量とポリアミノキシダーゼ活性が極めて高い値を示した被験者（図3C）におけるMRI断層写真を示す。図3Cに示されるように、血漿中のアクロレイン量とポリアミノキシダーゼ活性が高かった患者では、両側前頭・側頭頂および基底核に多発性の梗塞が認められた。また脳の萎縮および動脈硬化も認められた。

【産業上の利用可能性】

【0032】

血漿中のアクロレイン含有量、ポリアミン含有量、あるいはポリアミノキシダーゼ活性の測定を行なうことからなる本発明の方法は、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断、及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングに有用である。また本発明の知見を利用して、ポリアミノキシダーゼを介する酸化的脱アミノ化により生体内ポリアミンからアクロレインを生成する経路を阻害することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞を予防したり、病状の進捗を阻止することができる可能性がある。更に本発明の知見を利用して、ポリアミノキシダーゼを阻害する化合物を探索することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の治療薬を得ることができる可能性がある。

【図面の簡単な説明】

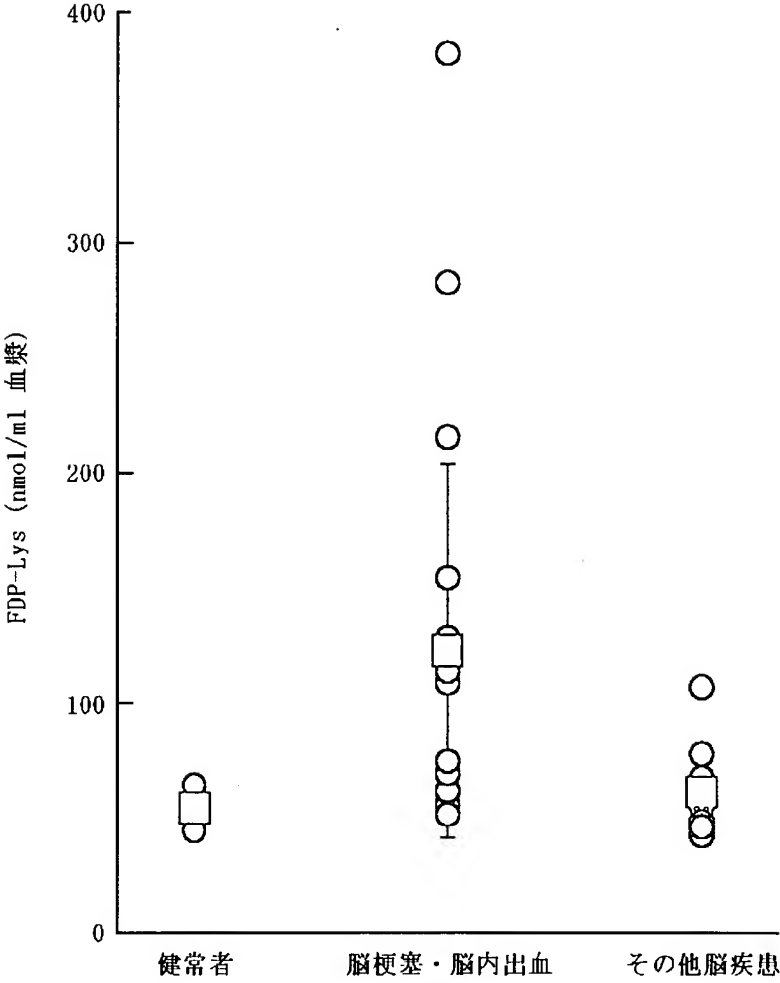
【0033】

【図1】図1は、血漿中のFDP-リジン量を、脳梗塞・脳内出血群と、健常者群及びその他脳疾患群の間で比較したグラフである。

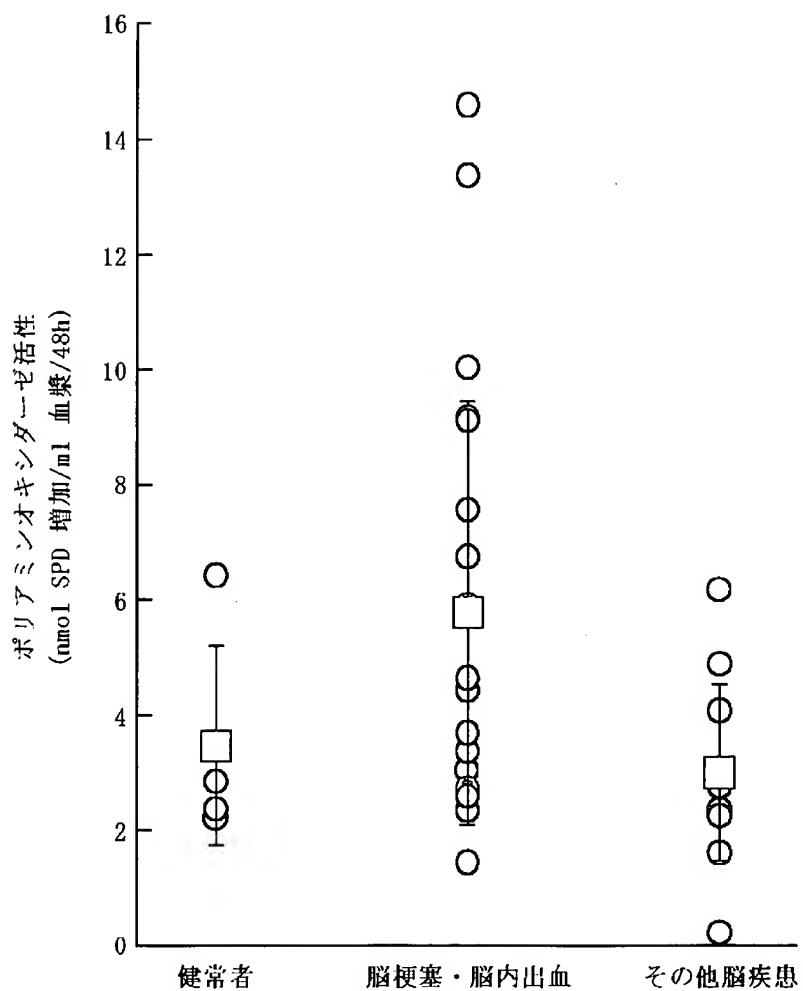
【図2】図2は、血漿中のポリアミノキシダーゼ活性を、脳梗塞・脳内出血群と、健常者群及びその他脳疾患群の間で比較したグラフである。

【図3】図3は、MRIにより頭部の断面画像解析を行った結果を示す写真である。

【書類名】図面
【図 1】



【図 2】

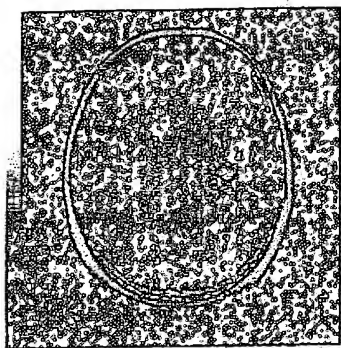
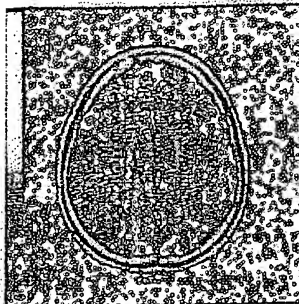


【図 3】

A



B



C

【書類名】要約書

【要約】

【課題】脳卒中・無症候性脳梗塞の診断及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングを行なうための簡便な方法を提供することが、本発明の課題である。

【解決手段】本発明により、血漿中のアクロレイン含有量、ポリアミン含有量、あるいはポリアミンオキシダーゼ活性の測定を行なうことからなる、脳卒中・無症候性脳梗塞の診断及び、脳卒中・無症候性脳梗塞患者のスクリーニングを行なう方法が提供された。本発明の知見は、ポリアミンオキシダーゼを阻害することにより脳卒中・無症候性脳梗塞を予防したり、病状の進捗を阻止することができる可能性や、ポリアミンオキシダーゼを阻害する化合物を探索することにより、脳卒中・無症候性脳梗塞の治療薬を得ることができる可能性を示唆するものである。

【選択図】図1

出願人履歴

302064588

20021112

新規登録

東京都渋谷区広尾1-11-5-1403

株式会社 フューエンス

302064588

20040325

住所変更

東京都渋谷区広尾1-11-2 AIOS広尾ビル703号

株式会社 フューエンス

501127833

20010329

新規登録

千葉県千葉市中央区東千葉3-3-2

五十嵐 一衛

501127833

20050324

住所変更

千葉県市川市市川南3-12 C-1102

